



Bubuk minuman kedelai



© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	1
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji bubuk minuman kedelai.....	4
Bibliografi	43

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Bubuk minuman kedelai* ini merupakan SNI baru. Standar ini dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Melindungi konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi industri bubuk minuman kedelai.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan
3. Undang-Undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
5. Peraturan Pemerintah No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan
6. Peraturan Pemerintah No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan
7. Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
8. Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam Berat dalam Makanan atau revisinya.
9. Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan atau revisinya.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67 – 04 Makanan dan minuman, Departemen Perindustrian, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 24 Nopember 2009 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 22 Maret 2010 sampai dengan tanggal 22 Juni 2010 dengan hasil akhir RASNI.

Bubuk minuman kedelai

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, komposisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji bubuk minuman kedelai.

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

bubuk minuman kedelai

produk berbentuk bubuk berbahan baku kedelai (*Glycine max*) dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan, yang digunakan untuk minuman dan dikemas secara kedap

4 Komposisi

4.1 Bahan baku utama

kedelai dan atau tepung kedelai.

4.2 Bahan pangan lain

bahan pangan lain yang diizinkan.

4.3 Bahan tambahan pangan

bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk bubuk minuman kedelai sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu

Syarat mutu bubuk minuman kedelai sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu bubuk minuman kedelai

No.	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	normal, khas bubuk minuman kedelai
1.2	Warna	-	normal
1.3	Rasa	-	normal
2	Kadar air (b/b)	%	maks. 10,0
3	Abu (b/b)	%	maks. 6,0
4	Kadar lemak (b/b)	%	min. 17,0
5	Kadar protein (N x 6,25) (b/b)	%	min. 30,0
6	Serat kasar (b/b)	%	maks. 3,0

Tabel 1 (lanjutan)

No.	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
7	Cemaran logam		
7.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
7.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,25
7.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40
7.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
8	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,25
9	Cemaran mikroba		
9.1	Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)	koloni/g	maks. 5×10^4
9.2	Bakteri <i>Coliform</i>	APM/g	maks. 1×10^2
9.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3
9.4	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif/25 g
9.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	negatif/g
9.6	<i>Bacillus cereus</i>	koloni/g	maks. 1×10^2
9.7	Kapang	koloni/g	maks. 5×10^1

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428, Petunjuk pengambilan contoh padatan.

7 Cara uji

Cara uji untuk bubuk minuman kedelai seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji abu sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji kadar protein sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji serat kasar sesuai Lampiran A.7
- h) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.8
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.8.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.8.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.8.3
- i) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.9
- j) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.10
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.10.1
 - Cara uji angka lempeng total (35 °C, 48 jam) sesuai Lampiran A.10.2
 - Cara uji bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.10.3
 - Cara uji *Salmonella* sp., sesuai Lampiran A.10.4
 - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran A.10.5
 - Cara uji *Bacillus cereus* sesuai Lampiran A.10.6
 - Cara uji Kapang sesuai Lampiran A.10.7

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai pasal 5.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam kemasan yang tertutup kedap, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan. Untuk produk yang menggunakan kedelai hasil rekayasa genetika, pada komposisi/ daftar bahan harus mencantumkan tulisan “kedelai hasil rekayasa genetika /GMO.”



Lampiran A
(normatif)
Cara uji bubuk minuman kedelai

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh bubuk minuman kedelai dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh bubuk minuman kedelai dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh bubuk minuman kedelai dan ambil contoh sebanyak 400 g kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan**A.2.1 Bau****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Warna**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- d) Jika berwarna putih hingga kekuning-kuningan, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- e) jika terlihat selain warna putih hingga kekuning-kuningan, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.3 Rasa

A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.3 Kadar air

A.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

A.3.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator yang berisi desikan; dan
- d) Cawan tertutup.

A.3.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama kurang lebih satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya) (W_0);
- b) masukkan 2 g contoh ke dalam cawan, tutup, dan timbang (W_1);
- c) panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan disamping cawan di dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama 1 (satu) jam setelah suhu oven $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$;

- d) tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang (W_2);
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung kadar air dalam contoh.

A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 2% dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 2% analisis harus diulang kembali.

A.4 Abu

A.4.1 Prinsip

Kadar abu dihitung berdasarkan bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu $(525 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih.

A.4.2 Peralatan

- a) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Desikator yang berisi desikan; dan
- g) Cawan berukuran 50 mL sampai dengan 100 mL.

A.4.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan dalam tanur pada suhu $(525 \pm 5) ^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- b) masukkan 5 g sampai dengan 10 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- c) panaskan cawan yang berisi contoh dalam oven pada suhu $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$ sampai kandungan air hilang;
- d) tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu $(525 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih;
- e) tambahkan air ke dalam abu, keringkan dalam penangas air kemudian dilanjutkan pada pemanas listrik kemudian diabukan kembali pada suhu $(525 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai mencapai berat yang tetap;

- f) pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang (W_2);
- g) lakukan pekerjaan duplo; dan
- h) hitung abu dalam contoh.

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Abu (\%)} = \left(\frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil perhitungan abu. Jika kisaran lebih besar dari 5% maka uji harus diulang kembali.

A.5 Kadar lemak

A.5.1 Prinsip

Hidrolisis lemak dalam contoh uji menggunakan HCl kemudian diekstraksi dengan petroleum eter. Ekstrak petroleum eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

A.5.2 Peralatan

- a) Alat Soxhlet lengkap;
- b) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Penangas air;
- e) Timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring ukuran (33 x 80) mm;
- f) Desikator yang berisi desikan;
- g) Labu didih 250 mL;
- h) Gelas piala 500 mL atau 300 mL;
- i) Kertas saring bebas lemak;
- j) Kaca arloji; dan
- k) Batu didih.

A.5.3 Pereaksi

- a) Larutan asam klorida (HCl) 8 M;
- b) Petroleum eter;
- c) Larutan perak nitrat (AgNO_3) 0,1 M; dan
larutkan $17,0 \pm 0,1$ g AgNO_3 p.a. dengan air suling menjadi 1 000 mL.
- d) Air suling.

A.5.4 Cara kerja

A.5.4.1 Hidrolisis

- Timbang 4 g sampai dengan 5 g contoh yang telah dipersiapkan (W) dengan teliti ke dalam gelas piala 300 mL atau 500 mL;
- tambahkan 45 mL air suling mendidih dengan perlahan sambil diaduk hingga homogen;
- tambahkan 55 mL HCl 8 M (2 bagian HCl ditambah 1 bagian air dan beberapa butir batu didih;
- tutup gelas piala tersebut dengan kaca arloji lalu didihkan perlahan-lahan selama 15 menit;
- cuci kaca arloji dengan 100 mL air suling dan masukkan air pembilas tersebut ke dalam gelas piala;
- saring endapan menggunakan kertas saring bebas lemak;
- bilas gelas piala 3 kali dengan air suling, lakukan pencucian hingga bebas klor yang dapat ditentukan dengan penambahan 1 tetes sampai dengan 3 tetes AgNO_3 0,1 M pada filtrat, jika tidak terdapat endapan putih (AgCl) maka telah bebas klor; dan
- pindahkan kertas saring serta isinya ke dalam timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring bebas lemak dan keringkan 6 jam sampai dengan 18 jam pada suhu 100 °C sampai dengan 101 °C.

A.5.4.2 Ekstraksi

- Keringkan labu didih yang berisi beberapa butir batu didih selama 1 jam;
- dinginkan dalam desikator dan timbang (W_0), sambungkan dengan alat ekstraksi *Soxhlet*;
- masukkan timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring ke dalam *Soxhlet* (sebaiknya timbal ditopang *glass bead* untuk meyakinkan daya kerja yang efisien), kemudian tuangkan petroleum eter sebanyak 2/3 kapasitas labu di atas penangas;
- ekstrak selama 4 jam dengan kecepatan ekstraksi lebih dari 30 kali;
- keringkan labu didih beserta lemak di dalam oven pada suhu 100 °C sampai dengan 101 °C selama 1,5 jam sampai dengan 2 jam;
- dinginkan dalam desikator dan timbang (W_1); dan
- ulangi pengeringan sampai perbedaan penimbangan bobot lemak yang dilakukan berturut-turut kurang dari 0,05%.

A.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_0}{W} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

W_0 adalah bobot labu lemak kosong, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot labu lemak kosong dan lemak, dinyatakan dalam gram (g).

A.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil kadar lemak. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.6 Kadar protein ($N \times 6,25$)

A.6.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan H_2SO_4 menggunakan katalis $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dan K_2SO_4 untuk meningkatkan titik didihnya. Destruksi ini bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam amonium. Garam amonium tersebut diuraikan menjadi NH_3 pada saat destilasi menggunakan $NaOH$. NH_3 yang dibebaskan akan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

A.6.2 Peralatan

- Labu *Kjeldahl* 100 mL;
- Alat destilasi *Kjeldahl* ;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik/alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- Buret 10 mL terkalibrasi; dan
- Batu didih.

A.6.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H_2SO_4 pekat bebas nitrogen;
- Larutan katalis tembaga, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ bebas nitrogen 0,05 g/mL H_2O ; larutkan 5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dengan air suling menjadi 100 mL, lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas
- Katalis selen; campurkan 4 g bubuk SeO_2 , 150 g K_2SO_4 atau Na_2SO_4 dan 30 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- Kalium sulfat, K_2SO_4 bebas nitrogen;
- Larutan indikator *methyl red* (MR)/*bromocresol green* (BCG); larutkan 0,2 g MR dengan etanol 95% menjadi 100 mL. Larutkan 1,0 g BCG dengan etanol 95% menjadi 500 mL. Campurkan 1 bagian larutan MR dan 5 bagian larutan BCG dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- Larutan asam borat, H_3BO_3 4%; larutkan 40 g H_3BO_3 dengan air suling menjadi 1 000 mL dan tambahkan 3 mL larutan indikator MR/BCG, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- Larutan natrium hidroksida, $NaOH$ 30%; larutkan 600 g hablur $NaOH$ dengan air suling menjadi 2 000 mL, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- Larutan indikator fenolftalein (PP) 1%; larutkan 1 g bubuk indikator PP dengan alkohol 95% dan encerkan menjadi 100 mL.
- Larutan asam klorida, HCl 0,1000 M; dan pipet dengan hati-hati 8,60 mL HCl pekat (36,5% sampai dengan 38%) ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan ditetapkan normalitasnya.
- Batu didih.

A.6.4 Cara kerja

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl*, tambahkan 15,00 g K_2SO_4 , 1 mL larutan katalis $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ atau 1 g campuran katalis selen, 8 butir sampai dengan 10 butir batu didih dan 25 mL H_2SO_4 pekat;

- b) panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisapan asap;
- c) biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- d) tambahkan 75 mL larutan NaOH 30% (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- e) suling selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 mL, dengan penampung destilat adalah 50 mL larutan H₃BO₃ 4%;
- f) bilas ujung pendingin dengan air suling;
- g) titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,100 0 M (N); dan
- h) kerjakan penetapan blanko.

A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,25 \times 100\%}{W}$$

Keterangan:

- V₁ adalah volume HCl 0,100 0 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 V₂ adalah volume HCl 0,100 0 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 N adalah normalitas larutan HCl;
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);
 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;
 6,25 adalah faktor protein untuk kedelai.

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.7 Serat kasar

A.7.1 Prinsip

Serat kasar adalah bagian yang tidak dapat dihidrolisis oleh asam sulfat (H₂SO₄ 1,25%) dan natrium hidroksida (NaOH 3,25%). Bagian tersebut dihitung secara gravimetri.

A.7.2 Peralatan

- a) Oven
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Pompa vakum;
- d) Pendingin tegak;
- e) Erlenmeyer 500 mL
- f) Gelas piala;
- g) Corong *Buchner*;
- h) Mortar;
- i) Cawan aluminium atau porselen;
- j) Kertas saring tak berabu yang mempunyai spesifikasi *particle retention liquid* sebesar 20 sampai dengan 25 µm; dan
- k) Sudip atau sendok.

A.7.3 Perekasi

- a) Larutan asam sulfat (H_2SO_4) 1,25%;
larutkan 13,02 mL H_2SO_4 p.a (96%) dengan air suling menjadi 1 000 mL.
- b) Larutan NaOH 3,25%;
larutkan 3,25 g NaOH dengan air suling menjadi 100 mL.
- c) Petroleum eter; dan
- d) Etanol 96%.

A.7.4 Cara Kerja

A.7.4.1 Menghilangkan lemak

- a) Timbang 2 g sampai dengan 4 g contoh (W) kemudian keringkan dalam oven selama kurang lebih 3 jam pada suhu 100 °C kemudian masukkan ke dalam tabung sentrifuse 250 mL;
- b) tambahkan 100 mL eter kemudian tabung ditutup dan dikocok sehingga lemak larut dalam eter kemudian disaring;
- c) cuci saringan dengan eter;
- d) larutan kemudian di sentrifugasi selama 10 menit pada 2 000 rpm dan supernatan dibuang;
- e) tambahkan 100 mL eter untuk ekstraksi kembali dan lakukan pasal d;
- f) tambahkan 100 mL eter, tabung ditutup, dan kocok;
- g) segera tuangkan ke dalam labu *rotary evaporator* dan lakukan evaporasi eter selama \pm 20 menit hingga kering;
- h) pindahkan seluruh residu ke dalam mortar menggunakan sudip atau sendok yang bersih dan kering kemudian tumbuk hingga halus;
- i) setelah halus, pindahkan kembali ke cawan alumunium atau porselen dan keringkan selama 10 menit sampai dengan 15 menit dalam penangas air untuk menghilangkan sisa eter; dan
- j) keringkan dalam oven pada suhu 100 °C selama 1 jam sehingga diperoleh contoh kering bebas lemak.

A.7.4.2 Ekstraksi serat kasar

- a) Masukkan semua contoh kering bebas lemak ke dalam Erlenmeyer 500 mL, tambahkan 50 mL larutan H_2SO_4 1,25% kemudian didihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin tegak;
- b) tambahkan 50 mL NaOH 3,25% kemudian didihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin tegak;
- c) dalam keadaan panas, saring dengan corong *Buchner* yang berisi kertas saring yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya;
- d) cuci endapan yang terdapat pada kertas saring berturut-turut dengan H_2SO_4 1,25% panas, air panas dan etanol 96%;
- e) angkat kertas saring beserta isinya, masukkan ke oven dan keringkan pada suhu 105 °C dinginkan dan timbang sampai bobot tetap (W_1);
- f) bila ternyata kadar serat kasar lebih besar dari 1 %, abukan kertas saring beserta isinya, timbang sampai bobot tetap (W_2); dan
- g) lakukan pekerjaan duplo.

A.7.5 Perhitungan

$$\text{Serat kasar (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

W₁ adalah bobot endapan, dinyatakan dalam gram (g);

W₂ adalah bobot abu, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10% dari nilai rata-rata hasil serat kasar. Jika kisaran lebih besar dari 10%, maka uji harus diulang kembali.

A.8 Cemaran logam

A.8.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.8.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.8.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur 10 mL;
- Gelas piala 250 mL;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 µm sampai dengan 25 µm.

A.8.1.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO₃ pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.

- e) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- g) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 4 mL, 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,2 $\mu\text{g/mL}$, 0,4 $\mu\text{g/mL}$, 0,8 $\mu\text{g/mL}$, 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- j) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Pb.
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL, 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1,0 $\mu\text{g/mL}$, 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.

A.8.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) $^{\circ}\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu (450 ± 5) $^{\circ}\text{C}$ kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;

- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.8.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.8.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang.

A.8.2 Timah (Sn)

A.8.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.8.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 5 mL berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) Gelas ukur kapasitas 50 mL; dan
- j) Gelas piala 250mL.

A.8.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air suling menjadi 100 mL.
- b) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- c) Asam klorida, HCl pekat;

- d) Larutan baku 1 000 µg/mL Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL, 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 µg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn

A.8.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- f) tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- g) tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh:

A.8.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.8.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.8.3 Merkuri (Hg)

A.8.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.8.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG), terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 mL

A.8.3.3 Pereaksi

- Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2%;
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,135 4 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.

- k) Larutan baku kerja Hg; dan pipet masing-masing 0,25 mL, 0,5 mL, 1 mL, dan 2 mL larutan baku 1 µg/mL ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 µg/mL, 0,005 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,02 µg/mL Hg.
- l) Batu didih.

A.8.3.4 Cara kerja

A.8.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran HNO_3 : HClO_4 (1 : 1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh;

A.8.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;

- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh;

A.8.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

fp adalah faktor pengenceran.

A.8.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.9 Cemaran arsen (As)

A.9.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang 193,7 nm.

A.9.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG), terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) *Microwave digester*
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) Pemanas listrik;
- f) *Burner* atau *bunsen*;
- g) Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- h) Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL.
- i) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- j) Gelas ukur 25 mL;
- k) Pipet volumetrik 25 mL, terkalibrasi;
- l) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- m) Cawan porselen 50 mL; dan
- n) Gelas piala 200 mL.

A.9.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;

- c) Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- d) Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, jenuh;
- e) Hidrogen peroksida, H_2O_2 ;
- f) Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- g) Asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10%;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan kalium iodida, KI 20%;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- k) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,320 3 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20% dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1 : 1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku As 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- m) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan baku As 100 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- n) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL, 2,0 mL, 3,0 mL, 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$, 0,02 $\mu\text{g/mL}$, 0,03 $\mu\text{g/mL}$, 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.9.4 Cara kerja

A.9.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (m) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan HClO_4 , tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0.1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;

- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.9.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$, 0,02 $\mu\text{g/mL}$, 0,03 $\mu\text{g/mL}$, 0,04 $\mu\text{g/mL}$, 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.9.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi arsen dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

fp adalah faktor pengenceran.

A.9.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.10 Cemaran mikroba

A.10.1 Persiapan dan homogenasi contoh untuk angka lempeng total, bakteri *Coliform*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

A.10.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.10.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi dilengkapi dengan *bulp* atau *pipettor*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

A.10.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- air suling 500 mL

Atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan tabung reaksi sebanyak 9 mL, kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.10.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.10.2 Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)

A.10.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu (35 ± 1) °C.

A.10.2.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi.
- Otoklaf;
- Penangas air bersirkulasi (45 ± 1) °C
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Botol pengencer 160 mL, terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 ml dilengkapi *bulp* atau *pipettor*; dan
- Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

A.10.2.3 Pembenihan dan pengencer

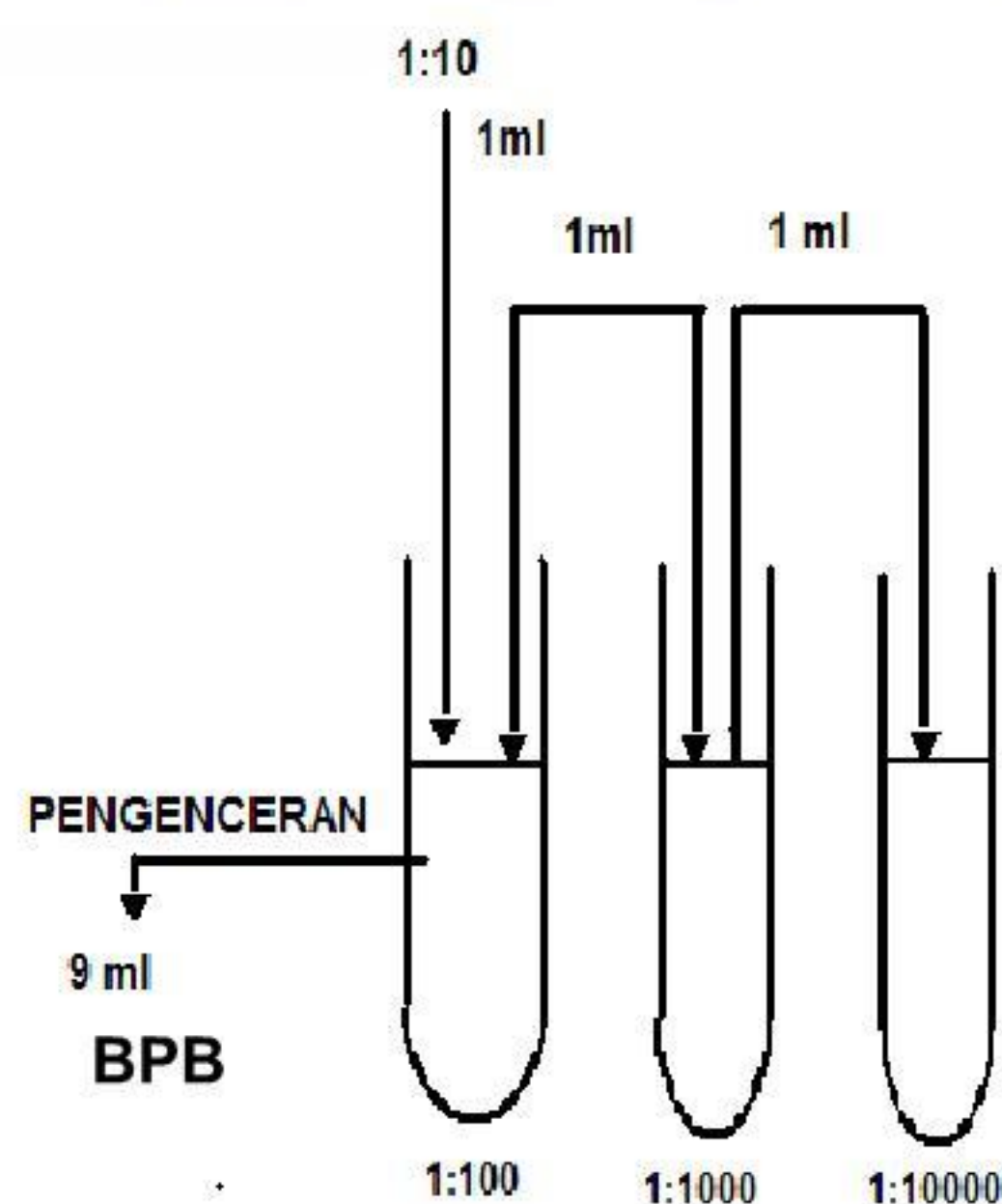
Plate count agar (PCA)

- | | |
|-----------------|----------|
| – tryptone | 5 g |
| – yeast extract | 2,5 g |
| – glukosa | 1 g |
| – agar | 15 g |
| – air suling | 1 000 mL |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

A.10.2.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*

- pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran (F) 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu (45 ± 1) °C ke dalam masing-masing cawan petri;
- goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;

- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam; dan
- h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.10.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.10.2.6 Pernyataan hasil

A.10.2.6.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
- n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
- n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;
- d adalah pengenceran pertama yang dihitung.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;

- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.10.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
- bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.10.3 Bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli*

A.10.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, sedangkan pertumbuhan bakteri *E. coli* diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.10.3.2 Peralatan

- Inkubator, $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- Rak untuk tabung reaksi;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril, berskala;
- Botol pengencer, terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- Tabung reaksi dan Tabung *Durham*;

- g) Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- h) Jarum Ose dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.10.3.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose* (LST) *broth* / *lauryl tryptose* (LT) *broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile* (BGLB) *broth* 2%;
- c) *Escherichia coli* (EC) *broth*;
- d) *Agar Levine's eosin methylene blue* (L-EMB);
- e) *Plate count agar* (PCA);
- f) *Gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) *Pereaksi Kovacs'*;
- i) *Methyl red – Voges Proskauer* (MR – VP) *broth*;
- j) *Pereaksi Voges Proskauer*;
- k) Larutan merah metil;
- l) *Koser's citrate broth*;
- m) *Peptone diluents* 0,1%;
- n) *Pereaksi indol*;
- o) Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- p) *Butterfield's Phosfat Buffered Dilution Water* (BPB);
- q) Larutan alfa naftol 5%; dan
- r) Kristal kreatin.

A.10.3.4 Cara kerja

A.10.3.4.1 APM - Uji pendugaan untuk bakteri *Coliform*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.10.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *lauryl sulfate tryptose* (LST) *broth* yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

A.10.3.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *Coliform*

- a) Kocok tabung LST *broth* yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung BGLB *broth* 2% yang berlainan;
- c) masukkan tabung-tabung BGLB *broth* 2% ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;

- d) tentukan APM sesuai dengan Tabel A.2, berdasarkan jumlah tabung BGLB *broth* yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada $35\text{ }^{\circ}\text{C}$; dan
- e) laporkan bakteri *Coliform* sebagai APM per gram.

A.10.3.4.3 APM - Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- a) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung EC *broth* yang berlainan;
- b) inkubasikan tabung-tabung EC *broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2)\text{ }^{\circ}\text{C}$, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan "positif";
- c) apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif"; dan
- d) lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.10.3.4.4 Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- a) Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati;
- b) goreskan/tanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm;
- c) inkubasikan piringan L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $(35 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- d) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam;
- e) dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diduga *E. coli* pada tabung agar miring PCA;
- f) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan gunakan untuk uji selanjutnya; dan
- g) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E. coli* adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti di bawah ini, serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas:
 - uji indol
 - Inokulasi tabung *tryptone (tryptophane) broth*;
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;
 - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi *Kovacs*'; dan
 - uji indol adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.
 - uji *Voges Proskauer*
 - Inokulasi tabung medium MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;
 - pindahkan 1 mL biakan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril;
 - tambahkan 0,6 mL larutan alfa naftol 5% dalam alkohol dan 0,2 ml larutan KOH 40% serta beberapa butir kristal kreatin; dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji merah metil
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung; dan
 - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah dan negatif bila terbentuk warna kuning.

- uji sitrat
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan hati-hati menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain;
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35 °C; dan
 - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
- uji pembentukan gas dari laktosa
 - Inokulasi tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C; dan
 - amati tabung - tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.10.3.4.5 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 - Reaksi biokimia *Escherichia coli* pada uji IMVIC

<i>Escherichia coli</i>	Indol	Merah metil	Voges Proskaeur	Sitrat
Varietas I	+	+	-	-
Varietas II	-	+	-	-

- a) Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila:
- Uji IMVIC mengikuti pola + + - - atau - + - - sesuai dengan Tabel A.2.;
 - pewarnaan gram menunjukkan gram negative bentuk batang tidak berspora; dan
 - terbentuknya gas dalam LST broth dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C.
- b) Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 - APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	< 3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93

Tabel A.2 (Lanjutan)

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1 100
2	1	2	27	3	3	3	> 1 100

A.10.4 *Salmonella* sp.

A.10.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.10.4.2 Peralatan

- Inkubator, $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator*, $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- Otoklaf;
- Oven;
- Neraca, kapasitas 2 000 gram, dengan ketelitian 0,1 gram;
- Neraca, kapasitas 120 gram, dengan ketelitian 5 mg;
- Penangas air, $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- pH meter;
- Blender dengan kecepatan putaran 10 000 sampai dengan 12 000 rpm dan blender jar (botol) steril;
- Botol bertutup ulir bermulut lebar 500 ml steril, labu Erlenmeyer 500 ml steril, *beaker*, 250 ml steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 mL dan 10 mL dengan ketelitian 0,1 mL;
- Tabung reaksi atau tabung kultur steril, 10 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- Beaker* plastik, 4 liter, dapat diotoklaf, untuk menyangga kantong plastik selama pengocokan dan inkubasi;
- Rak tabung reaksi atau rak tabung kultur;
- Vorteks *mixer*;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran 15 mm x 100 mm) steril;
- Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- Jarum Ose, ujung runcing dan bulat (berukuran diameter 3 mm);
- Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril;

- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *bunsen burner*; dan
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 - 8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna.

A.10.4.3 Pembenihan dan pereaksi

- a) Laktose *broth*;
- b) *Tetrathionate* (TT) *broth*;
- c) *Rappaport-Vassiliadis* (RV) *medium* (RV *medium* harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi RV *medium* tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) *Xylose lysine desoxycholate* (XLD) *agar* (*agar* XLD);
- e) *Hektoen enteric* (HE) *agar* (*agar* HE);
- f) *Bismuth sulfite* (BS) *agar* (*agar* BS);
- g) *Triple sugar iron* (TSI) *agar* (*agar* TSI);
- h) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);
- i) *Trypticase soy-tryptose broth* (TSTB);
- j) *Methyl red-Voges Proskeaur* (MR-VP) *broth*
- k) *Simmons citrate agar* (*agar* *Simmons citrate*);
- l) *Urea broth*;
- m) *Rapid urea broth*;
- n) *Malonate broth*;
- o) *Lysine iron agar* (LIA) (Edward dan Fife)
- p) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);
- q) *Potassium cyanide* (KCN) *broth*;
- r) *Phenol red carbohydrate broth* (*Phenol red lactose broth* dan *Phenol red red sucrose broth*) atau *Purple carbohydrate broth* (*Purple lactose broth* dan *Purple sucrose broth*);
- s) *Phenol red dulcitol* atau *Purple broth base* dengan 0,5% *dulcitol*;
- t) *MacConkey agar* (*agar* *MacConkey*);
- u) *Brain heart infusion* (BHI) *broth*;
- v) *Tryptose blood agar base*;
- w) *Pereaksi Kovacs'*;
- x) *Pereaksi uji Voges-Proskauer* (VP);
- y) Kristal keratin fosfat;
- z) Larutan kalium hidroksida (KOH), 40%;
- aa) Larutan *bromocresol purple dye*, 0,2%;
- bb) Indikator merah metil;
- cc) Indikator *phenol red* atau *bromocresol purple*;
- dd) Air suling steril;
- ee) Larutan *physiological saline*, 0,85% (steril);
- ff) Larutan *formanilized physiological saline*;
- gg) *Formanilized antigen*;
- hh) Alfa naftol;
- ii) *Salmonella polyvalent somatic* (O) *antiserum*;
- gg) *Salmonella polyvalent flagellar* (H) *antiserum*;
- kk) *Salmonella polyvalent somatic* (O) *antiserum*; dan
- ll) *Salmonella somatic group* (O) *antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai.

A.10.4.4 Cara Kerja**A.10.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan**

- Timbang 25 g contoh secara aseptis dan tuang secara hati-hati dan perlahan ke dalam 500 mL botol pengencer yang berisi 225 mL laktosa *broth* yang steril;
- biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup, tanpa diganggu; dan
- kendurkan tutup wadah secukupnya $\frac{1}{4}$ putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35°C .

A.10.4.4.2 Pengkayaan

- Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 mL media Rappaport-Vassiliadis (RV) dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *tetrathionate broth* (TT *broth*) dan vortex masing-masing campuran tersebut; dan
- inkubasikan media RV pada suhu $(42 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi dan TT *broth* pada $(35 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam.

A.10.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose 3 mm, goreskan biakan pengkayaan TT *broth* ke dalam cawan petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- inkubasikan cawan-cawan BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi (24 ± 2) jam; Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi (24 ± 2) jam.

Morfologi koloni *Salmonella* sp. mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa biakan *Salmonella* sp. memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.

HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

- jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut;
- dengan menggunakan jarum Ose ujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media agar miring TSI dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena *reaksi lysine decarboxylase*

- sangat anaerobik, agar miring LIA harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu (5 - 8) °C;
- g) inkubasi agar miring TSI dan LIA pada suhu 35 °C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S yang berlebihan. Pada TSI, biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan alkalin (merah) pada media agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa memproduksi H₂S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA, biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan reaksi alkalin (ungu) pada tusukan pada tabung agar tegak. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan negatif. Umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk H₂S pada LIA. Beberapa biakan non *Salmonella* sp. membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
 - h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA, tanpa memperhatikan reaksi TSI, akan dianggap sebagai *Salmonella* sp. dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang menghasilkan asam pada tusukan pada media agar tegak LIA dan alkalin pada agar miring serta reaksi asam pada tusukan pada media agar tegak TSI harus dipertimbangkan juga sebagai *Salmonella* sp. dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media agar tegak LIA dan asam pada agar miring TSI, serta reaksi asam pada tusukan di media agar tegak TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. Bila biakan TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* sp. (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari medium selektif yang tidak memberikan biakan duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA sesuai dengan pasal f di atas; dan
 - i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - tiga biakan presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TT *broth*, dan tiga biakan presumtif yang diinokulasikan dari RV;
 - jika tiga biakan presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 biakan TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

A.10.4.5 Identifikasi *Salmonella* sp.

A.10.4.5.1 Biakan campuran

- a) Apabila biakan agar TSI terlihat tercampur, maka goreskan kembali kedalam media agar *MacConkey*, HE atau XLD. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang diduga *Salmonella* sp., yaitu:
 - Agar *Mac Conkey*. Koloni tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* sp. akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
 - Agar *Hektoen Enteric* (HE). Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam;
 - Agar *Xylose Lysine desoxycholate* (XLD). Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA sesuai dengan A.10.4.4.3.f dan lanjutkan sesuai dengan A.10.4.4.3.g.

A.10.4.5.2 Biakan murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum ose runcing ke dalam tabung *urea broth*. Karena kadang-kadang tabung *urea broth* yang

tidak diinokulasi biakan akan berubah warna menjadi merah keunguan (uji positif) maka perlu dibuat tabung urea broth tanpa inokulasi sebagai kontrol. Inkubasikan tabung-tabung tersebut selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan

b) Uji urease (cepat).

Inokulasikan koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose 3mm ke dalam tabung *rapid urea broth*. Inokulasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Biakan *Salmonella* sp. akan memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna) pada uji urease, walaupun demikian perlu uji lebih lanjut.

A.10.4.5.3 Pengujian biakan urease negatif

a) *Lysine Decarboxylase Broth* (LDB);

Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 Ose koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari agar miring TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* sp. memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2% *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.

b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5% *dulcitol*; dan

inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah inkubasi 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *Durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

c) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);

Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:

- *Potassium Cyanide* (KCN) *broth*

Pindahkan 1 Ose biakan dari TB 24 jam ke dalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat (bila perlu lapisi dengan parafin/lilin). Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* sp. tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.

- *Malonate broth*

Pindahkan 1 Ose dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.

- Uji indol

Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi *kovacs'*. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan biakan sebagai bukan *Salmonella* sp. bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif.

A.10.4.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
 - BHI *broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
 - *Trypticase Soy Tryptose broth* (TSTB) dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL biakan di atas.
- b) siapkan 2 biakan dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan ± 0,5 mL larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai dengan 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.
 - Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
 - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
 - non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.10.4.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum Ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) *antiserum* ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*;
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.10.4.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., biakan yang memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3 pasal 1 - 11. Jika 1 biakan TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella* sp., uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Biakan yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* sp. pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai dengan A.10.4.5.1 diatas dan uji kembali sesuai dengan A.10.4.5.2. Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap biakan yang tidak memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
- Inokulasi broth ini dengan biakan TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *Durham*. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika biakan memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp., kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;
- Ikuti prosedur sesuai dengan A.10.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. pada biakan yang memberikan reaksi positif, kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) *Methyl Red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*;
- Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :
- Pindahkan 1 mL MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - Tambahkan 0,6 mL alfa naftol dan aduk;
 - Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40% dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
 - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi VP negatif.
- Uji merah metil (MR)
- Tambahkan 5 tetes indikator merah metil ke dalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
 - amati hasilnya dengan segera; dan
 - umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.
- Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.
- d) *Agar Simmons citrate*.
- Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil sitrat positif;
 - negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.10.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* sp. biakan-biakan yang mempunyai reaksi sesuai dengan Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan-biakan yang memberikan reaksi sesuai dengan Tabel A.4. Bila tidak ada 1 biakan TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* sp. pada uji biokimia, lakukan uji biokimia sesuai dengan A.10.4.5.3 terhadap biakan yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. sp. reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	<i>Glucose</i> (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	hitam	tidak hitam	+
4.	Urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	KCN broth	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	Uji <i>indole</i>	permukaan berwarna nila	permukaan berwarna kuning	-
10.	Uji <i>Polyvalent flagellar</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	Uji <i>Polyvalent somatic</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15.	Uji <i>methyl red</i>	merah menyebar	kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

Keterangan:
^a+ adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari;
 - adalah 90% atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;
 V adalah variabel;
^b adalah mayoritas dari kultur *Salmonella arizonae*: negatif;
^c adalah mayoritas dari kultur *Salmonella arizonae*: positif.

Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	Substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji <i>indole</i> dan <i>polivalent flagellar</i> (H)	positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan <i>KCN broth</i>	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b
6	<i>KCN broth</i> , uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan <i>methyl red</i>	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a adalah test <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> sp., uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i> sp..		

A.10.5 *Staphylococcus aureus*

A.10.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulasi.

A.10.5.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Spreader* steril dari gelas;
- Botol pengencer 500 ml;
- Pipet ukur 10 ml dan 1 ml;
- Tabung reaksi;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- Jarum Ose.

A.10.5.3 Pembenihan dan pereaksi

- Baird-parker agar* (BPA);
- Brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- Plasma koagulase kelinci.

A.10.5.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.10.1;
- pipet 1ml larutan contoh ke dalam 3 cawan petri berisi media BPA berbeda (misalkan 1 mL dibagi menjadi 0,3 mL; 0,3 mL; dan 0,4 mL);
- sebar contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh medium (± 10 menit). Jika contoh tidak mudah terserap oleh media, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik;
- inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan

- e) pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung koloni yang diduga sebagai *Staphylococcus aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum Ose.

A.10.5.5 Uji koagulasi

- Pindahkan 5 koloni sampai dengan 10 koloni yang diduga *Staphylococcus aureus* ke dalam tabung berisi 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL BHIB;
- inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- tambahkan plasma koagulase kelinci sebanyak 0,5 mL ke dalam kultur BHIB dan campur;
- inkubasikan campuran plasma koagulase kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam dan kemudian amati terbentuknya gumpalan setiap 6 jam. *Staphylococcus aureus* positif apabila terbentuk gumpalan yang kokoh dan utuh serta dapat bertahan didalam tabung ketika dibalikkan; dan
- amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi.

A.10.5.6 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terjadi koagulasi, maka hasil dinyatakan “negatif”; dan
- Jika terjadi koagulasi, maka hasil dinyatakan “positif”.

A.10.6 *Bacillus cereus*

A.10.6.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* ditandai dengan terbentuknya koloni eosin merah muda penghasil *lechitinase*, yang diikuti dengan uji penegasan pada berbagai media.

A.10.6.2 Peralatan

- Inkubator (30 ± 2) °C dan (35 ± 2) °C, terkalibrasi;
- Alat homogenisasi yang sesuai dengan kecepatan putaran 18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm;
- Penangas air, (48 – 50) °C;
- Mikroskop, *microscope slides* dan *cover slips*;
- Alat penghitung koloni;
- Vorteks mixer*;
- Bunsen* besar dan kecil;
- Rak tabung biakan;
- Botol pengencer, steril;
- Tabung anaerobik *GasPak* dilengkapi dengan H₂ + CO₂ *generator envelopes* dan katalisnya;
- Tabung biakan (13 mm x 100 mm), steril;
- Pipet ukur 10 mL, 5 mL, dan 1 mL, berskala 0,1 mL steril;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm) steril;
- Batang penyebar steril, diameter 3 mm sampai dengan 4 mm dengan sebaran area 45 mm sampai dengan 55 mm;
- Jarum Ose, berukuran 2 mm dan 3 mm; dan
- Pena penanda.

A.10.6.3 Media dan pereaksi

- a) Agar mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar plates;
- b) Egg yolk emulsion, 50%;
- c) Trypticase soy-polymyxin broth;
- d) Larutan polimiksin B untuk agar MYP (0,1%) dan trypticase soy-polymyxin broth (0,15%);
- e) Lisozim 0,001%;
- f) Phenol red glucose broth;
- g) Agar tirosin;
- h) Lysozyme broth;
- i) Media Voges-Proskauer;
- j) Nutrient broth;
- k) Nitrate broth;
- l) Nutrient agar (NA) untuk *Bacillus cereus*;
- m) Pereaksi sulfanilic acid;
- n) Pereaksi alfa naftol;
- o) Butterfield's phosphate-buffered dilution water (BPB) yang disterilkan dalam botol dengan volume akhir 450 ± 5 mL dan 90 ± 2 mL;
- p) Pereaksi uji Voges-Proskauer;
- q) Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- r) Kristal kreatin; dan
- s) Metanol.

A.10.6.4 Persiapan contoh

- a) Timbang 50 g contoh ke dalam blender yang bersih dan steril, secara aseptis. Tambahkan 450 mL butterfield's phosphate-buffered dilution water (BPB) (1:10) dan kocok selama 2 menit pada kecepatan tinggi (18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm); dan
- b) buat seri pengenceran dengan menggunakan larutan BPB (1:10).

A.10.6.5 Penetapan *Bacillus cereus***A.10.6.5.1 APM – *B. cereus***

- a) Teknik APM direkomendasikan untuk menghitung *B.cereus* dalam contoh yang diharapkan mengandung *B. cereus* lebih kecil dari 10 per gram contoh;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung trypticase soy-polymyxin broth;
- c) inkubasikan tabung-tabung tersebut dalam inkubator pada suhu $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (48 ± 2) untuk melihat pertumbuhan bakteri *B. cereus*;
- e) gores biakan dari tabung yang positif dengan Ose ke dalam media agar MYP dan inkubasi selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
- f) ambil 1 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan lechitinase positif dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B.cereus* sesuai dengan A.10.6.6; dan
- g) Hitunglah APM *B.cereus* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung-tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *B. cereus*.

A.10.6.5.2 Angka lempeng total - *B. cereus*

- Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} dengan memindahkan 10 mL contoh yang telah dihomogenkan ke dalam 90 ml larutan pengencer, aduk dengan kuat dan lanjutkan ke pengenceran 10^{-6} ;
- inokulasi sebanyak 0,1 mL masing-masing tingkat pengenceran (termasuk 1:10) menggunakan batang penyebar steril di atas permukaan media agar MYP, lakukan secara duplo;
- inkubasi media agar MYP pada suhu 30 °C selama 24 jam;
- amati koloni yang dikelilingi oleh zona endapan yang menunjukkan bahwa *B. cereus* menghasilkan *lecithinase* berwarna merah muda. Warnanya akan menjadi lebih jelas apabila inkubasi dilanjutkan;
- jika warna merah muda tidak jelas, lanjutkan inkubasi selama 24 jam lagi sebelum perhitungan koloni,
- pilih media yang mengandung 15 koloni sampai dengan 150 koloni eosin merah muda penghasil *lecithinase*;
- beri tanda di bagian dasar cawan petri berdasarkan zona yang terbentuk menggunakan pena penanda untuk memudahkan perhitungan dan penjumlahan koloni *B. cereus*;
- ambil 5 atau lebih koloni yang positif mengandung *B. cereus* dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B.cereus* sesuai dengan A.10.6.6; dan
- hitung jumlah *B.cereus* per gram contoh berdasarkan persentase koloni yang telah diuji dan ditegaskan sebagai *B. cereus*.

$$B. cereus \text{ (koloni/g)} = n \times \frac{A}{B} \times F \times 10$$

Keterangan:

n adalah Jumlah rata-rata koloni pada satu tingkat pengenceran;

A adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *B. cereus*;

B adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang positif *B. cereus*;

F adalah factor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai;

10 adalah factor pengenceran dari jumlah contoh yang diinokulasikan (0,1 mL).

Contoh perhitungan:

Jika jumlah rata-rata yang diperoleh pada pengenceran 10^{-3} adalah 65 dan 4 dari 5 koloni telah diuji dan ditegaskan sebagai *B. cereus* maka:

$$B.cereus \text{ (koloni/g)} = 65 \times 4/5 \times 1.000 \times 10 = 520.000$$

Keterangan:

Faktor pengenceran lebih tinggi sepuluh kali dari pengenceran contoh sebab hanya 0,1 mL contoh diuji

A.10.6.6 Uji penegasan untuk *B. cereus*

A.10.6.6.1 Biakan campuran

- Ambil 5 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk penegasan *B.cereus*;
- inkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C;
- lakukan pengamatan secara mikroskopis, disertai pewarnaan gram. *B. cereus* akan tampak berbentuk batang besar, gram positif, dengan rantai pendek hingga panjang, spora berbentuk ellips, letaknya ditengah sampai sub terminal dan spora tersebut tidak menggembungkan sporangium;

- d) pindahkan biakan dengan Ose 3 mm dari setiap agar miring ke tabung (13 x 100) mm yang mengandung 0,5 mL larutan BPB steril kemudian dikocok dengan *vorteks*, untuk mensuspensikan biakan; dan
- e) suspensi biakan ini digunakan untuk penegasan *B. cereus* berikut:

A.10.6.6.2 Uji *phenol red glucose broth*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm ke dalam 3 mL *phenol red glucose broth* dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut secara anaerobik selama 24 jam pada suhu 35 °C dalam tabung anaerobik GasPak; dan
- c) kocok tabung tersebut dengan kuat dan amati pertumbuhan *B.cereus* yang ditandai oleh peningkatan kekeruhan dan perubahan warna dari merah ke kuning yang menunjukkan bahwa asam telah dihasilkan secara anaerobik dari glukosa. Perubahan warna dari merah ke orange/kuning bisa terjadi pada sebagian tabung kontrol yang tidak diinokulasi. Hal ini disebabkan oleh terjadinya pengurangan pH akibat pemaparan media oleh CO₂ yang terbentuk dalam tabung anaerobik GasPak. Gunakan kontrol positif dan kontrol negatif untuk menyakinkan perbedaan antara reaksi positif dan positif palsu.

A.10.6.6.3 Uji *nitrate broth*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 3 mm ke dalam 5 mL *nitrate broth* dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- c) untuk uji nitrit, tambahkan 0,25 mL masing-masing pereaksi *sulfanilic acid* dan pereaksi alfa naftol ke dalam setiap tabung; dan
- d) warna oranye yang terbentuk dalam 10 menit menunjukkan bahwa nitrat telah direduksi menjadi nitrit.

A.10.6.6.4 Uji media *modified VP*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 3 mm ke dalam 5 mL media VP dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
- c) untuk uji terbentuknya *acetylmethyl-carbinol*, pipet 1 mL biakan ke dalam tabung uji (16 x 125) mm, tambahkan 0,6 mm larutan alfa naftol, dan 0,2 mL KOH 40%;
- d) aduk dan tambahkan sedikit kristal kreatin;
- e) amati setelah didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang; dan
- f) uji media *modified VP* positif apabila terbentuk warna merah muda atau violet.

A.10.6.6.5 Uji agar tirosin

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 3 mm ke seluruh permukaan media miring agar tirosin;
- b) inkubasi media miring tersebut selama 48 jam pada suhu 35 °C;
- c) amati zona bening sekitar pertumbuhan bakteri yang terbentuk, yang menunjukkan bahwa tirosin telah terdekomposisi; dan
- d) jika hasil uji adalah negatif maka inkubasi dilanjutkan sampai total 7 hari sebelum hasil dinyatakan negatif.

A.10.6.6.6 Uji *lysozyme broth*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm ke dalam 2,5 mL *nutrient broth* yang mengandung lisozim 0,001% dalam tabung;
- b) inokulasikan juga suspensi biakan ke dalam 2,5 mL *nutrient broth* sebagai kontrol positif;
- c) inkubasi tabung-tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;

- d) amati pertumbuhan dalam *lysozyme broth* dan dalam kontrol *nutrient broth*; dan
- e) inkubasi tabung yang negatif selama 24 jam lagi sebelum dibuang.

A.10.6.6.7 Uji agar MYP

- a) Uji ini tidak diperlukan apabila hasil uji telah jelas dengan menggunakan media agar MYP dan tidak ada gangguan dari mikroorganisme yang lain;
- b) bagi bagian dasar cawan petri menjadi 6 bagian sampai dengan 8 bagian yang sama menggunakan pena penanda;
- c) inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm disetiap bagian agar MYP tersebut dengan cara menyentuh permukaan agar MYP secara hati-hati. Dalam satu cawan petri dapat diuji 6 atau lebih biakan;
- d) biarkan inokulum diserap sempurna sebelum diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- e) amati terbentuknya *lecithinase* yang ditunjukkan oleh zona presipitasi disekitar pertumbuhan;
- f) manitol tidak difermentasi oleh isolat jika media tempat tumbuh dan sekitarnya berwarna eosin merah muda. Warna kuning menunjukkan terbentuknya asam dari manitol; dan
- g) koloni *B. cereus* biasanya positif *lecithinase* dan negatif manitol pada agar MYP.

A.10.6.6.8 Hasil uji penegasan *B. cereus*

Hasil uji penegasan menunjukkan sebagai *B. cereus* apabila:

- a) Menghasilkan gram positif dengan spora yang tidak sebesar sporangium;
- b) menghasilkan *lecithinase* dan tidak memfermentasikan manitol dalam media agar MYP;
- c) tumbuh dan menghasilkan asam dari glukosa secara anaerobic;
- d) mereduksi nitrat menjadi nitrit;
- e) menghasilkan *acetylmethylcarbinol*;
- f) menguraikan L-tirosin; dan
- g) tumbuh dalam media yang mengandung lisozim 0,001%.

A.10.7 Kapang

A.10.7.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

A.10.7.2 Peralatan

- a) Inkubator $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ terkalibrasi;
- b) Otoklaf;
- c) Penangas air, $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- d) pH meter
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Tally register;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril;
- h) Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- i) *Bent glass rod*.

A.10.7.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- a) Agar *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC);
- b) Agar *dichloran 18% glycerol* (DG 18);

c) Larutan pepton 0,1%;

- pepton 1 g
- air suling 1 000 ml

larutkan pepton dalam air suling kemudian sterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, dan atur pH sehingga mencapai pH akhir ($7,0 \pm 0,2$).

d) Larutan antibiotic.

Antibiotik ditambahkan dalam media kapang untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil selama proses dalam otoklaf. Konsentrasi antibiotik yang dianjurkan adalah 100 mg/L media. Jika terlihat pertumbuhan bakteri berlebihan, siapkan media dengan penambahan *chloramphenicol* 50 mg/L sebelum otoklaf dan *chlortetracycline* 50 mg/L steril saat media mulai dikondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.10.7.4 Persiapan dan homogenasi contoh

- a) Timbang 50 g contoh secara aseptis ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pepton 0,1% steril sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10; dan
- b) Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.10.7.5 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} dengan menggunakan larutan pepton 0,1 %;
- b) persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan salah satu metode dibawah ini, yaitu :
 - metode sebar (media DRBC atau DG 18), penggunaan media DG 18 lebih sesuai untuk contoh uji yang mempunyai a_w kurang dari 0,95: pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebar merata dengan menggunakan *bent glass rod*.
 - metode tuang (media DG 18):
 - pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media;
 - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
 - biarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat.
- c) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- d) hitung koloni kapang setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam; dan
- e) nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang per gram contoh.

A.10.7.6 Pernyataan hasil**A.10.7.6.1 Cara menghitung**

Hitung koloni kapang sesuai dengan A.10.2.6.1 untuk cawan yang berisi 10 koloni sampai dengan 150 koloni.

A.10.7.6.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan kapang sesuai dengan A.10.2.6.2

Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 950.49, Ash of Nuts and Nut Products*, 18th Edition, Chapter 40.1.08.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 932.06, Fat in Cacao Products*, 18th Edition, Chapter 31.4.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 935.53, Fiber (Crude) in Nuts and Nut Product*, 18th Edition, Chapter 40.1.07.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc*. 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 925.10, Solids (Total) and Moisture in Flour, Air Oven Method*, 18th Edition, Chapter 32.1.03.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 955.04C, Protein (Crude) in Nuts and Nut Product*, 18th Edition, Chapter 40.1.06.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 967.25, Salmonella in Foods, Preparation of culture media and reagents*. 18th Edition, Chapter 17.9.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric after Dry Ashing*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Bacillus cereus*. Chapter 14.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Yeast, Molds, and Mycotoxins*. Chapter 18.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sampling Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2006. *Salmonella*. Chapter 5.











BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id